

Федеральное государственное автономное учреждение высшего
профессионального образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

на правах рукописи

Блохин Дмитрий Сергеевич

**ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ ОЛИГОПЕПТИДОВ В
РАСТВОРЕ И В КОМПЛЕКСЕ С МОДЕЛЬЮ ПОВЕРХНОСТИ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ПО ДАННЫМ МЕТОДОВ
СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР**

01.04.07 – физика конденсированного состояния

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Казань – 2014

Работа выполнена на кафедре общей физики и в лаборатории ЯМР Института физики Казанского (Приволжского) Федерального Университета

Научный руководитель: **Клочков Владимир Васильевич**
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Волков Виталий Иванович**
доктор физико-математических наук,
профессор, заведующий лаборатории
ядерного магнитного резонанса
Института проблем химической физики
РАН

Зуев Юрий Федорович
кандидат физико-математических наук,
доктор химических наук, заведующий
лабораторией биофизической химии
наносистем Казанского института
биохимии и биофизики КазНЦ РАН

Ведущая организация: Московский Государственный
Университет имени М.В. Ломоносова,
г. Москва.

Защита состоится «25» декабря 2014 года в _____ на заседании
диссертационного совета Д 212.081.15 при Казанском (Приволжском)
федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И.
Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный
университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте
Казанского (Приволжского) федерального университета <http://www.kpfu.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2014 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук,
профессор

М.В. Еремин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Важнейшей задачей химической и биологической физики является установление пространственного строения органических и биоорганических соединений. Известно, что биологическая активность протеинов связана с их пространственным строением. При исследовании особенностей пространственной структуры и функций протеинов в ряде случаев оказывается полезным использовать их короткие фрагменты – олигопептиды (~ до 1,5 kDa). Изучение конформаций олигопептидов также важно, так как они являются структурными блоками полипептидов, и знание их строения может быть использовано для предсказания конфигурации цепей протеинов. Поскольку большая часть биохимических процессов протекает на поверхности мембраны клетки, то данные о пространственном строении комплекса олигопептид – поверхность мембраны, весьма важны для понимания механизмов этих процессов.

Традиционно, исследования пространственного строения биоорганических соединений в растворах основаны как на использовании данных одномерной ЯМР (^1H , ^{13}C) спектроскопии, включая анализ величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия, так и на использовании современных подходов в ЯМР, таких как двумерная гомоядерная (COSY, TOCSY и др.) и гетероядерная корреляционная (^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{15}N HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC и др.) спектроскопия, позволяющие регистрировать ЯМР параметры. Двумерная ЯМР NOESY спектроскопия (спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера), которая позволяет определять межпротонные расстояния между магнитными ядрами, отстоящими друг от друга на расстоянии до 5 Å, ограничено применима к молекулам, удовлетворяющим условию быстрого движения ($\omega_0 \cdot \tau_c \ll 1$, где ω_0 – частота ларморовой прецессии, τ_c – время корреляции молекулярного движения) (например, олигопептиды) и удобна при изучении молекул и молекулярных образований, подпадающих под условие медленного движения ($\omega_0 \cdot \tau_c \gg 1$).

При связывании молекул малой молекулярной массы с мицеллами на основе поверхностно-активного вещества образуется комплекс, молекулярная масса которого значительно превосходит массу несвязанной молекулы и исследуемое низкомолекулярное соединение переходит из разряда малых молекул (условие быстрого движения) в разряд молекул, подпадающих под условие медленного движения.

Объекты исследования.

В качестве объектов исследования были выбраны олигопептиды: тетрапептид SFVG (содержит ароматическую, алифатические и полярные группы), декапептид VIKKSTALLG (относится к классу водорастворимых олигопептидов, обладающих фармакологическим действием), а также фрагменты ВИЧ усиливающего пептида PAP248-286: начальный фрагмент – PAP248-261(GINKQKEKSRLQGG); два центральных участка – PAP266-

272(EILNHMK) и PAP262-270(VLVNEILNH); концевой фрагмент – PAP274-284(ATQIPSYKKLIMY) (рисунок 1).

В работе были исследованы мицеллы на основе додецилсульфата натрия, которые использовались как модель заряженной поверхности биологической мембраны.

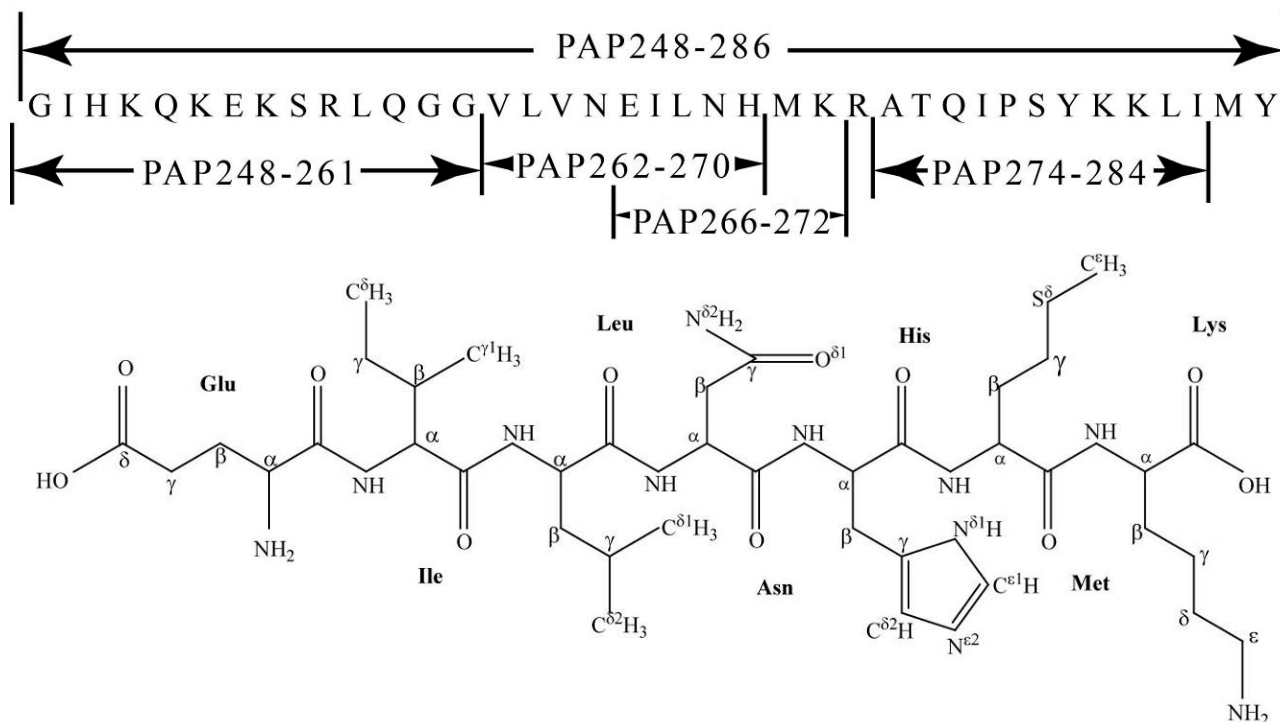


Рисунок 1. Аминокислотная последовательность пептида PAP248-286 и его фрагментов в общепринятых буквенных кодах, соответствующих номенклатуре IUPAC/IUBMB (сверху). Структурная формула гептапептида PAP266-272 (EILNHMK) (внизу).

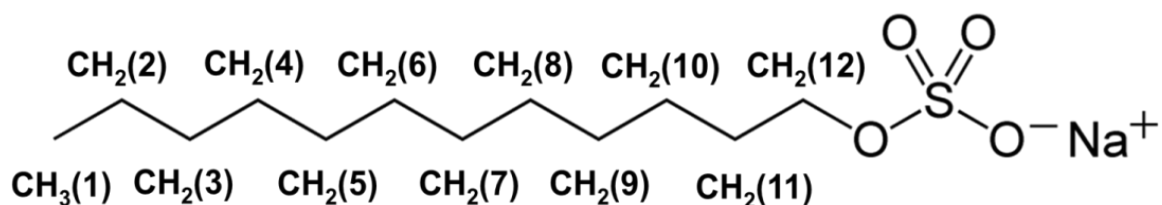


Рисунок 2. Структурная формула додецилсульфата натрия.

Цель и задачи исследования.

Целью настоящей работы являлось установление пространственного строения олигопептидов в растворе и комплексе с моделью поверхности биологической мембраны. Для достижения этой цели было необходимо выполнение следующих задач:

- разработка подхода для мониторинга формирования мицеллярных систем на основе додецилсульфата натрия (ДСН) в растворе;
- повышение эффективности метода двумерной спектроскопии ЯМР NOESY к исследованию пространственного строения молекул, подпадающих под условие быстрого движения;
- определение геометрических параметров исследуемых олигопептидов (координат атомов) в растворе и в комплексе «пептид-модель поверхности мембраны»;
- установление активных сайтов исследуемых олигопептидов РАР.

Методы исследования и использованная аппаратура.

При решении поставленных задач были использованы методы ЯМР спектроскопии высокого разрешения: одно- и двумерные гомо- и гетероядерные корреляционные ЯМР эксперименты (TOCSY, NOESY, HSQC и др.). Регистрацию 1М и 2М (^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C) спектров ЯМР проводили на ЯМР спектрометре AVANCE II-500 (Bruker) (500 МГц (^1H), 125,76 МГц (^{13}C)) при температуре 293 К. Расчет пространственных молекулярных структур методом молекулярной динамики с помощью современных развивающихся программ DYNAMO [1] и XPLOR-NIH [2].

На защиту выносятся положения, сформулированные в выводах.

Научная новизна:

- 1 Разработан подход для мониторинга формирования мицелл поверхностно-активного вещества (додецилсульфат натрия, ДСН) в растворе с помощью двумерной ^1H - ^1H NOESY ЯМР спектроскопии.
- 2 Предложен метод описания пространственной структуры олигопептидов на основе определения межъядерных расстояний (метод двумерной ^1H - ^1H NOESY ЯМР спектроскопии) путем перевода исследуемого низкомолекулярного соединения из разряда малых молекул (условие быстрого движения) в разряд молекул, подпадающих под условие медленного движения за счёт образования комплекса олигопептидов с мицеллами поверхностно-активного вещества (ДСН).
- 3 Впервые определено пространственное строение тетрапептида SFVG (только в комплексе), декапептида VIKKSTALLG и фрагментов пептида РАР248-286 в растворе и в комплексе с моделью заряженной поверхности биологической мембраны: РАР248-261, РАР266-272, РАР262-270 (только в комплексе), РАР274-284. Получены координаты атомов в формате pdb файла.

- 4 Впервые установлено наличие вторичной структуры в олигопептидах PАР262-270 и PАР274-284 в комплексе с мицеллами ДСН.
- 5 Предложены и описаны модели исследуемых комплексов «пептид-поверхность биологической мембраны». Установлены активные сайты пептида PАР248-286 участвующие в комплексообразовании с поверхностью мембраны (PАР265-268 и PАР281-283).

Обоснованность и достоверность результатов подтверждается: отсутствием противоречий с результатами других исследований, проводимых в этом направлении с помощью других подходов в спектроскопии ЯМР (как пример, подход, основанный на использовании парамагнитных агентов в экспериментах ЯМР); использованием современного ЯМР оборудования и программного обеспечения; методик, адекватных задачам исследования.

Научная и практическая ценность:

1. Предложенный подход мониторинга формирования мицеллярных систем на основе додецилсульфата натрия (ДСН) в растворе с помощью двумерной ^1H - ^1H NOESY ЯМР спектроскопии может быть использован при исследовании процессов мицеллообразования на основе подобных поверхностно-активных веществ.
2. Разработанный и экспериментально обоснованный подход к описанию пространственной структуры олигопептидов на основе определения межъядерных расстояний (^1H - ^1H NOESY ЯМР спектроскопия) путем перевода исследуемого низкомолекулярного соединения из разряда малых молекул (условие быстрого движения) в разряд молекул, подпадающих под условие медленного движения, может быть применен при исследовании подобных биоорганических соединений.
3. Установленные спектральные параметры ЯМР (^1H , ^{13}C) и измеренные межпротонные расстояния в изученных соединениях могут быть использованы в качестве справочного материала. Координаты атомов (в pdb формате), входящих в состав изученных пептидов могут использоваться при сравнении с координатами атомов аналогичных аминокислотных последовательностей (в частном случае фрагментов цепей полипептидов).
4. Определены активные сайты пептида PАР248-286, которые могут участвовать в связывании вириона вируса ВИЧ с поверхностью мембраны. Данная информация крайне полезна в поиске лекарственных препаратов, снижающих вероятность заражения ВИЧ, за счет препятствования комплексообразованию вируса ВИЧ и пептида PАР248-286.

Личный вклад автора.

Участие в постановке целей и задач исследования. Проведение ЯМР экспериментов и написание статей по теме исследования. Автору принадлежат результаты интерпретации спектров ЯМР (информация о геометрии исследованных соединений) и результаты компьютерного моделирования молекулярных структур.

Апробация работы.

Основные результаты докладывались и обсуждались на следующих конференциях: III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии "МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА" (г. Москва, 2010); Магнитный резонанс в химической и биологической физике (г. Новосибирск, 2010); Итоговая конференция Казанского (Приволжского) Федерального Университета (г. Казань, 2010); V Всероссийская конференция "Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях" (г. Казань, 2011); Международная молодежная научная школа «Актуальные проблемы магнитного резонанса и его приложений» (г. Казань, 2012); II международный симпозиум КФУ – РИКЕН, посвященный междисциплинарным исследованиям (г. Казань, 2012); Международный симпозиум «Биохимия – основа наук о жизни» (г. Казань, 2013); конкурс на соискание именных стипендий мэра г. Казани (г. Казань, 2013); XX Всероссийская научная конференция студентов-физиков и молодых ученых (г. Ижевск, 2014).

Диссертационная работа выполнена в лаборатории ЯМР Института Физики Казанского (Приволжского) Федерального Университета. Работа на отдельных этапах поддерживалась грантами РФФИ (09-03-00077а), Министерства образования и науки РТ (13-03-97041), Министерства образования и науки РФ (К(П)ФУ, 2.2792.2011), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (02.740.11.0702).

Изученные в работе соединения синтезированы в лаборатории пептидного синтеза отделения химии поверхностных явлений технического университета Лулео под руководством доктора физико-математических наук Филиппова А.В. (Luleå University of Technology, Luleå, SE-91187, Sweden).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 17 работ, из них 9 статей в рецензируемых изданиях, 8 – тезисы докладов.

Объем и структура работы.

Диссертация изложена на 149 (включая 2 страницы приложения) страницах машинописного текста и содержит 68 рисунков, 24 таблицы; включает введение, пять глав, основные результаты и выводы, публикации автора по теме диссертации, список литературы из 130 наименования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована цель, описаны методы и объекты исследования, научная новизна и практическая значимость полученных результатов, представлены выносимые на защиту научные положения.

В первой главе даны физические основы ЯМР спектроскопии, представлены импульсные последовательности (HSQC, HMBC, TOCSY, NOESY), которые были использованы при выполнении работы.

В этой главе дан анализ зависимости интенсивностей кросс-пиков $I_{\alpha\beta}$ и диагональных пиков $I_{\alpha\alpha}$ от времени смешивания τ_m^{opt} (рисунок 3) в NOESY экспериментах. При оптимальном времени смешивания, когда амплитуда кросс-пиков наибольшая, отношение интенсивностей кросс-пиков к диагональным равно [3]

$$\frac{I_{\alpha\beta}(\tau_m^{\text{opt}})}{I_{\alpha\alpha}(\tau_m^{\text{opt}})} = \pm \frac{R_C}{2R_L + R_C}$$

здесь R_C – константа скорости кросс-релаксации; R_L – константа скорости потери суммарной намагниченности.

Приводится теоретическое обоснование тому, что для малых молекул, подпадающих под условие быстрого движения ($\tau_C \ll \omega_0^{-1}$), значения кросс-пиков в 2М NOESY спектрах отрицательны и имеют малую интенсивность; для молекул, подпадающих под условие медленного движения ($\tau_C \gg \omega_0^{-1}$), кросс-пики имеют положительный знак. Далее в работе этот факт будет использован для мониторинга образования мицелл и комплексов олигопептидов с мицеллами.

Описаны подходы для определения величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия и межъядерных расстояний на основе 2М ЯМР спектроскопии. Представлены основы метода молекулярной динамики при расчете пространственных структур молекул.

Вторая глава содержит описание исследуемых в работе объектов (олигопептиды: тетрапептид SFVG (nAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe) и декапептид VIKKSTALLG (Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly); фрагменты пептида PAP248-286 (рисунок 1): PAP248-261 (GIHKQKEKSRLQGG), PAP266-272 (EILNHMK), PAP262-270 (VLVNEILNH), PAP274-284 (ATQIPSYKKLIMY); додецилсульфат натрия) и экспериментальных параметров проведенных ЯМР экспериментов.

Тетрапептид SFVG был выбран в качестве примера малых олигопептидов, подпадающих под условие быстрого движения ($\tau_C \ll \omega_0^{-1}$). Ранее в работе [4] было определено пространственное строение этого тетрапептида в растворе.

Декапептид относится к классу водорастворимых олигопептидов, обладающих фармакологическим (противовоспалительным) действием.

Пептид PAP248-286, состоящий из 39 аминокислотных остатков (рисунок 1), продуцируется простатой и содержится в семенной жидкости. Показано, что этот пептид формирует амилоидо-подобные фибриллы, образующие волокна вблизи клеточной мембраны и играющие определенную роль в оплодотворении [5]. Но присутствие волокон PAP может многократно увеличить риск инфекций, в том числе и ВИЧ, способствуя прикреплению вируса к живой клетке. Предполагается, что эти амилоидные волокна, известные как SEVI (англ. semen-derived enhancer of viral infection, полученный из семенной жидкости, усиливающий вирусную инфекцию), служат поликатионными мостами, нейтрализующими отрицательный заряд отталкивания между капсидом вируса и мембраной клетки - цели [6].

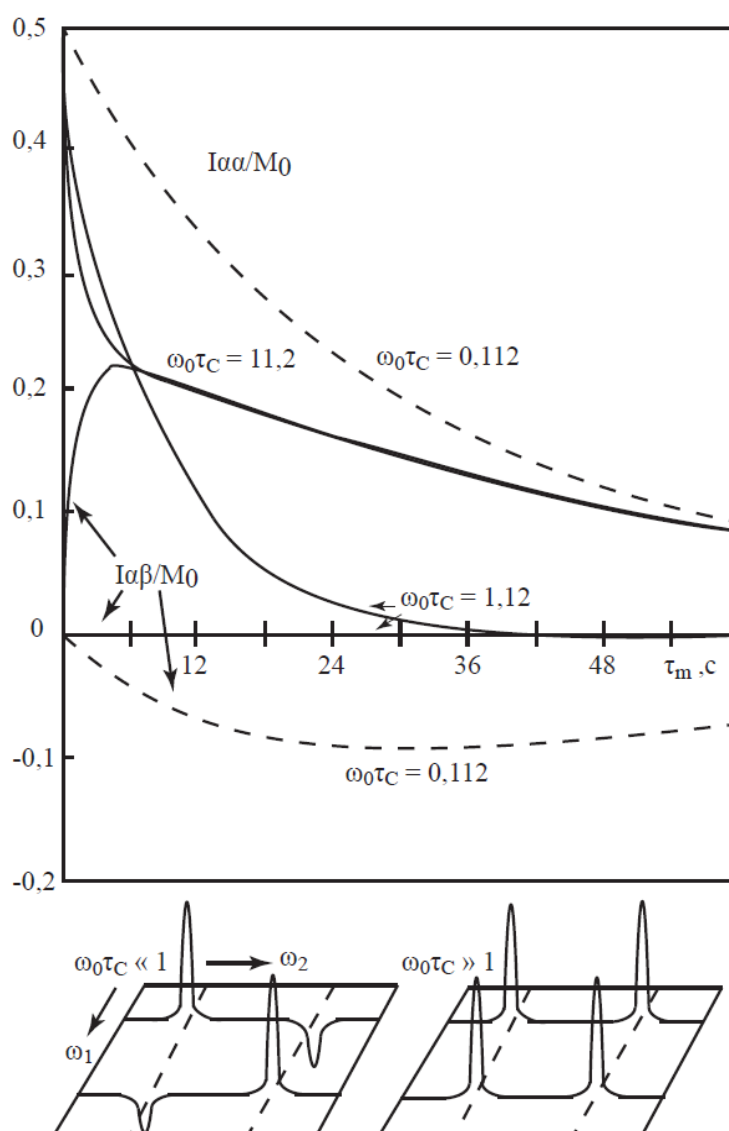


Рисунок 3. Зависимости интенсивности диагональных и кросс-пиков от времени смешивания для двухспиновой системы для трёх характерных времен корреляции: $\omega_0\tau_C = 11,2$ – длинное время корреляции; $\omega_0\tau_C = 0,112$ – короткое; $\omega_0\tau_C = 1,12$ – критические значения времени корреляции (интенсивности кросс-пиков равны нулю при любых временах смешивания τ_m) [3].

Наличие этого белка резко увеличивает инфекционную активность ВИЧ. Точный механизм неизвестен, но полагают, что повышение адгезии вируса со специфическим рецептором связывания обуславливается сокращением электростатического отталкивания между мембранами вируса и клетки-мишени [6].

Для установления механизма усиления инфекционной активности ВИЧ с помощью белка РАР248-286 важно знать сайты-связывания белка с мембраной и установить активные центры белка. Понимание этого механизма поможет в решении задачи о снижении вероятности заражения ВИЧ-инфекцией.

В работе РАР248-286 был разделен на четыре отдельных олигопептида (РАР248-261, РАР266-272, РАР262-270, РАР274-284) для детального изучения каждого фрагмента.

Додецилсульфат натрия – это натриевая соль лаурилсульфокислоты, анионоактивное, амфифильное поверхностно-активное вещество. Структурная формула ДСН представлена на рисунке 2.

Мицеллы являются удобной моделью мембранной поверхности для структурных исследований методом ЯМР спектроскопии [7, 8] и могут быть использованы для моделирования поведения протеинов на биологических мембранах для небольших гидрофобных протеинов [9]. В работе они используются как модель заряженной поверхности биологической мембраны.

В третьей главе описывается исследование мицелл на основе додецилсульфата натрия: образование мицелл и контроль мицеллообразования с помощью 1М и 2М ЯМР спектроскопии. Также предложена возможность использования мицелл ДСН в качестве модели заряженной поверхности биологической мембраны.

Мониторинг мицеллообразования ДСН с помощью 1М ЯМР спектроскопии основан на изменении разности химических сдвигов протонов метиленовой группы CH_2 (12) (рисунок 2) и метильной группы CH_3 (1) в спектрах ЯМР ^1H от концентрации ДСН в водном растворе. Были проведены температурные эксперименты мицеллярного раствора додецилсульфата натрия ($T = 5\text{-}35^\circ\text{C}$). При изменении температуры различий в химических сдвигах ДСН не наблюдалось, что может говорить о том, что мицеллы достаточно устойчивые образования.

Для контроля мицеллообразования ДСН с помощью 2М ЯМР спектроскопии были использованы 2М ^1H - ^1H NOESY ЯМР спектры. Как уже говорилось выше, интенсивности и знаки кросс-пиков в NOESY спектрах для больших и малых молекул различаются. Додецилсульфат натрия в мономерной форме относится к разряду малых молекул, подпадающих под условие быстрого движения, и кросс-пики в NOESY спектрах отрицательные (рисунок 4 а). Когда же ДСН образует мицеллы, то они подпадают под условие медленного движения и наблюдаются положительные кросс-пики в NOESY спектре (рисунок 4 б). Используя этот эффект, можно в процессе записи спектров контролировать существование ДСН в мономерной или мицеллярной форме.

Четвертая глава посвящена определению пространственного строения тетрапептида SFVG в комплексе с мицеллами додецилсульфата натрия, пространственной структуры декапептида VIKKSTALLG в растворе на основе анализа величин констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия и в комплексе с мицеллами додецилсульфата натрия. Как пример, на рисунке 5 приведен соотнесенный 1М ^1H ЯМР спектр декапептида в водном растворе.

На примере тетрапептида показано, что при образовании комплекса с мицеллами додецилсульфата натрия значительно увеличивается информативность 2М NOESY ЯМР спектров (рисунок 6).

Расчеты пространственных структур тетрапептида и декапептида в комплексе с мицеллами ДСН (рисунок 7) проводились на основе подходов молекулярной динамики с использованием программ DYNAMO [1] и XPLOR-NIH [2]. Входными параметрами были межъядерные расстояния, определенные из анализа 2М NOESY спектров с различным временем смешивания. Работа по установлению образования комплекса декапептид-мицелла проводилась совместно с Ефимовым Сергеем Владимировичем, на защиту выносятся структура данного олигопептида.

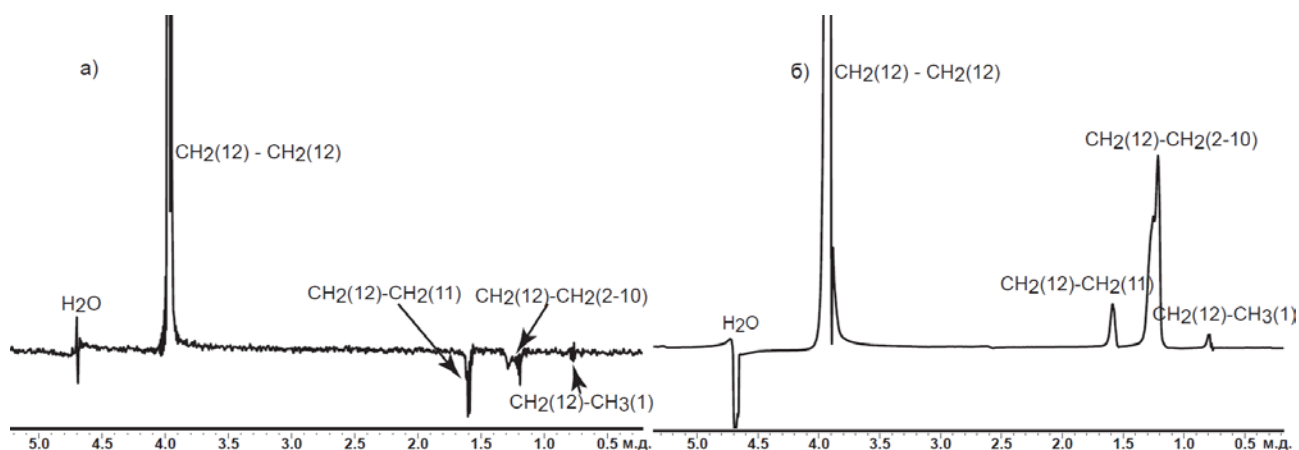


Рисунок 4. Проекция двумерных ЯМР NOESY спектров додецилсульфата натрия вдоль частоты, соответствующей $\delta = 3,93$ м.д. (химический сдвиг метиленовых протонов CH_2 (12)) в водном растворе: а) концентрация ДСН в водном растворе равна 2,2 г/л; б) концентрация ДСН в водном растворе равна 7,5 г/л.

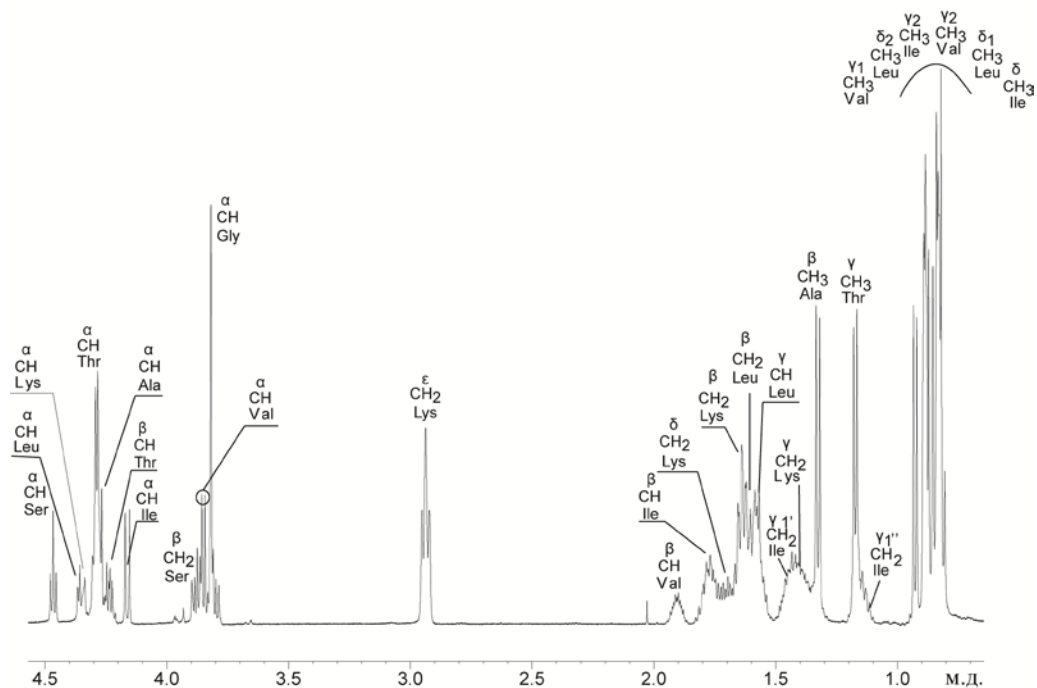


Рисунок 5. ^1H ЯМР спектр (500 МГц) декапептида VIKKSTALLG в водном растворе ($\text{H}_2\text{O}+\text{D}_2\text{O}/90\%+10\%$). Т 288 К.

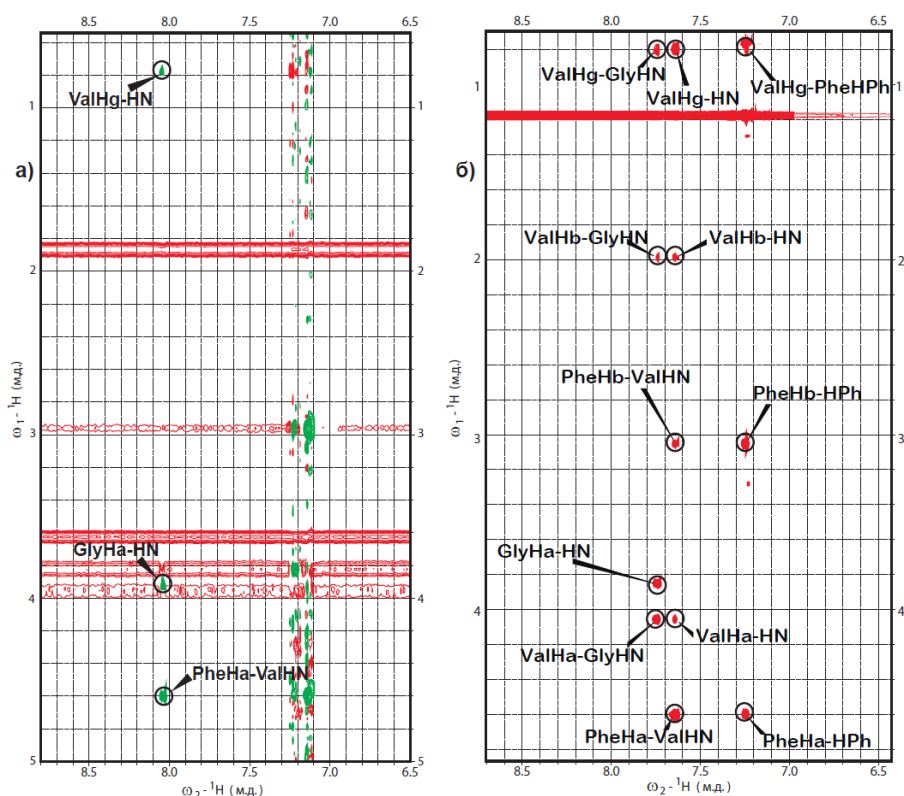


Рисунок 6. Двумерные ЯМР NOESY (^1H 500 МГц) спектры тетрапептида nAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe растворенного а) в воде и б) в смеси $\text{H}_2\text{O}+\text{D}_2\text{O}$ с додецилсульфатом натрия, находящемся в мицеллярном состоянии. Время смешивания $\tau_m = 0,25$ с.

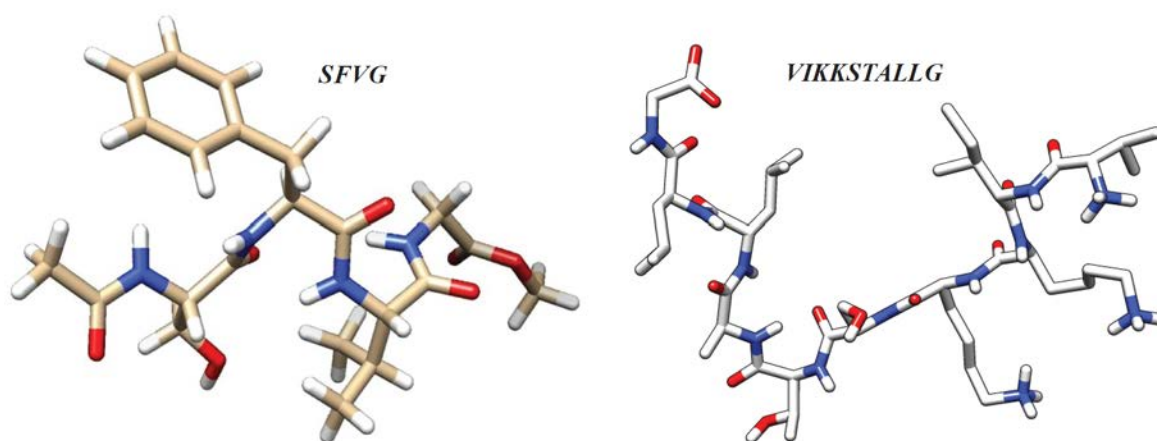


Рисунок 7. Пространственные структуры тетрапептида SFVG (слева) и декапептида VIKKSTALLG (справа) в комплексе с мицеллами додецилсульфата натрия, рассчитанная в программе XPLOR-NIH с использованием экспериментально определенных межъядерных расстояний.

При расчете пространственного строения декапептида VIKKSTALLG в водном растворе ($\text{H}_2\text{O}+\text{D}_2\text{O}$ / 90%+10%) (рисунок 8) в программе DYNAMO входными данными были величины остаточного диполь-дипольного взаимодействия ($^1D_{\text{CH}}$).

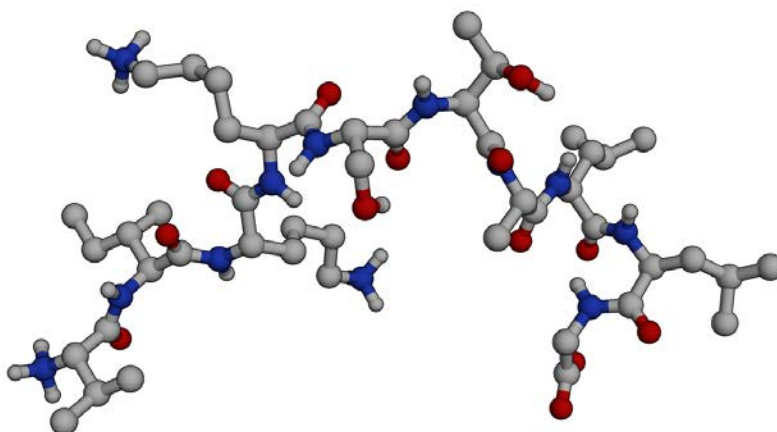


Рисунок 8. Конформация декапептида VIKKSTALLG в водном растворе ($\text{H}_2\text{O}+\text{D}_2\text{O}$ / 90%+10%).

Пятая глава посвящена изучению конформации фрагментов пептида РАР248-286. Глава состоит из четырех частей, в которых рассмотрено пространственное строение в растворе и комплексе «пептид-модель заряженной поверхности биологической мембраны» для каждого фрагмента (РАР248-261, РАР266-272, РАР262-270, РАР274-284). На основе полученных структурных данных были определены активные центры пептида РАР248-286, которые участвуют в связывании вириона вируса ВИЧ с мембраной.

В качестве примера, разберем процесс установления пространственного строения начального фрагмента PAP248-261 (GINKQKEKSRLQGG) (рисунок 9) в водном растворе и в комплексе с моделью заряженной поверхности биологической мембраны.

На первом этапе были соотнесены сигналы ЯМР спектров с химической структурой молекулы. Отнесение ^1H сигналов PAP248-261 (рисунок 10) было сделано с учетом данных двумерных ^1H - ^1H TOCSY (рисунок 11) спектров, сведений из литературы о химических сдвигах протонов в аминокислотных фрагментах, а также интегральных интенсивностей сигналов в спектрах ЯМР. Соотнесение сигналов ^{13}C с химической структурой пептида проводилось на основе анализа полученных химических сдвигов ^1H и двумерном гетероядерном ^1H - ^{13}C HSQC ЯМР эксперименте, спектр которого содержит сигналы, отвечающие за взаимодействие между ядрами водорода и углерода разделенными одной химической связью.

Пептид PAP248-261 является малой молекулой, и использование подхода, на основе ядерного эффекта Оверхаузера не эффективно для определения пространственной структуры. В связи с этим ограничением был использован подход, основанный на анализе величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия.

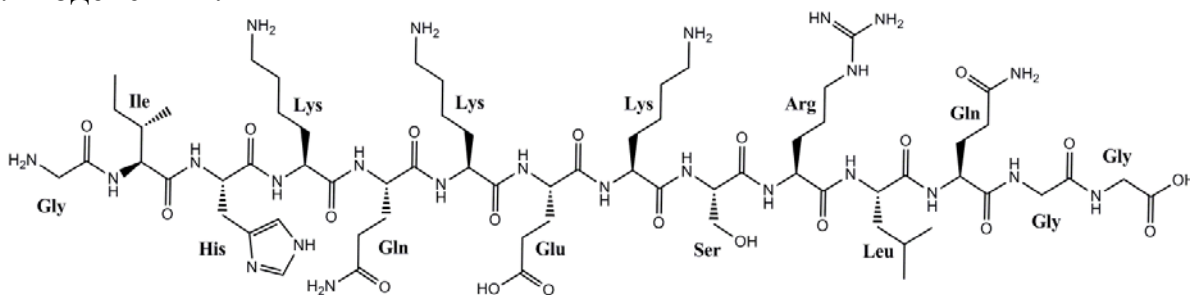


Рисунок 9. Структурная формула пептида PAP248-261.

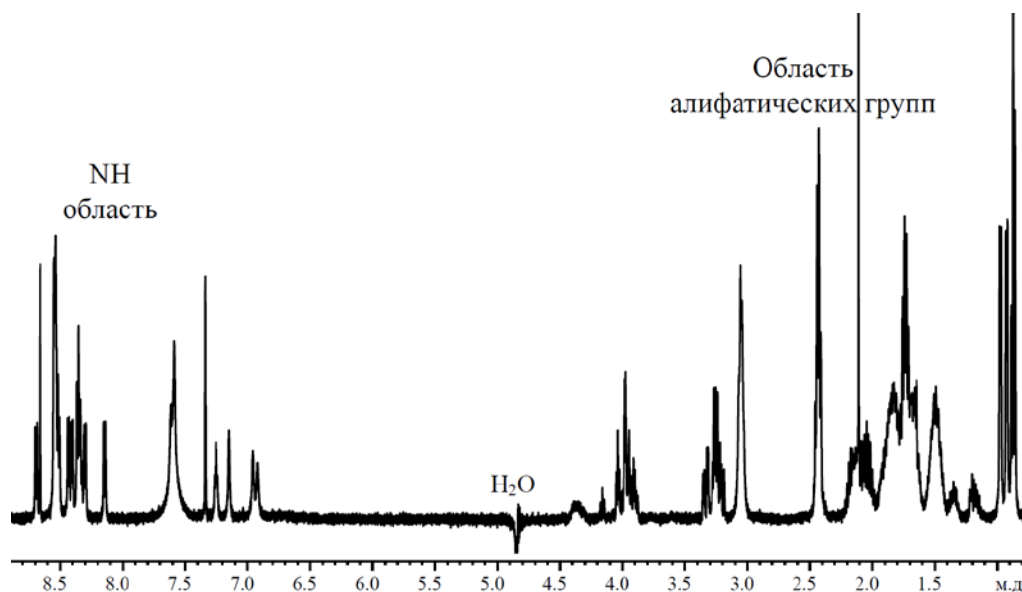


Рисунок 10. ^1H ЯМР спектр (500 МГц) пептида PAP248-261 (GINKQKEKSRLQGG) в водном растворе ($\text{H}_2\text{O}+\text{D}_2\text{O}/ 90\%+10\%$). Т 288 К.

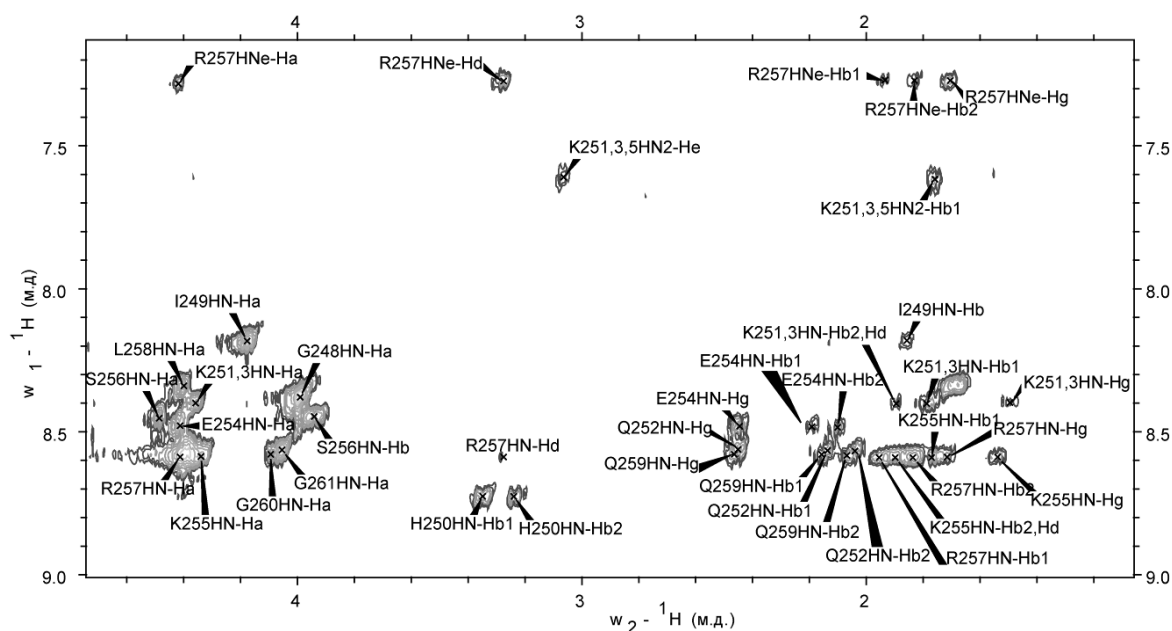


Рисунок 11. Часть двумерного ^1H - ^1H TOCSY ЯМР спектра (500 МГц) пептида PAP248-261 (GINKQKEKSRLQGG) в водном растворе ($\text{H}_2\text{O}+\text{D}_2\text{O}/ 90\%+10\%$). Т 288 К.

Величины остаточных диполь-дипольных взаимодействий были получены из гетероядерных ЯМР спектров ^1H - ^{13}C HSQC-HECADE. Определены прямые константы спин-спинового взаимодействия между ядрами ^1H и ^{13}C ($^1J_{\text{CH}}$) в воде (рисунок 12 а) и в жидкокристаллической лиотропной системе ($^1J_{\text{CH}} + ^1D_{\text{CH}}$) (рисунок 12 б).

Величины $^1D_{\text{CH}}$ были получены вычитанием величин констант спин-спинового взаимодействия ($^1J_{\text{CH}}$) для водных растворов из значений прямых констант спин-спинового взаимодействия, определенных в лиотропной жидкокристаллической среде ($^1J_{\text{CH}} + ^1D_{\text{CH}}$).

Так же для расчетов были использованы вицинальные константы спин-спинового взаимодействия ($^3J_{\text{NH-Ha}}$) между ядрами водорода NH и Ha групп, которые зависят от торсионных углов основной цепи пептида [10].

Построение пространственной структуры пептида PAP248-261 осуществлялось в программе XPLOR-NIH [2], использующей методы молекулярной динамики. Входными параметрами были величины остаточного диполь-дипольного взаимодействия $^1D_{\text{CH}}$ и вицинальные константы $^3J_{\text{NH-Ha}}$.

Из расчетов было выбрано 10 структур с минимальной энергией (рисунок 13). Среднее квадратичное отклонение (СКО) основной цепи центрального участка (His250 – Lys255) для выбранных 10 структур составило $1,37 \pm 0,32 \text{ \AA}$. Большое значение СКО обусловлено небольшими размерами пептида, что приводит к высокой подвижности, и отсутствием жесткой вторичной структуры.

Из расчетов получаем, что пространственная структура пептида PAP248-261 в растворе реализуется в виде случайного клубка (рисунок 13). Поскольку внутри молекулярная подвижность отдельных фрагментов пептида высокая, то полученная структура в растворе, рассматривается нами как оценочная.

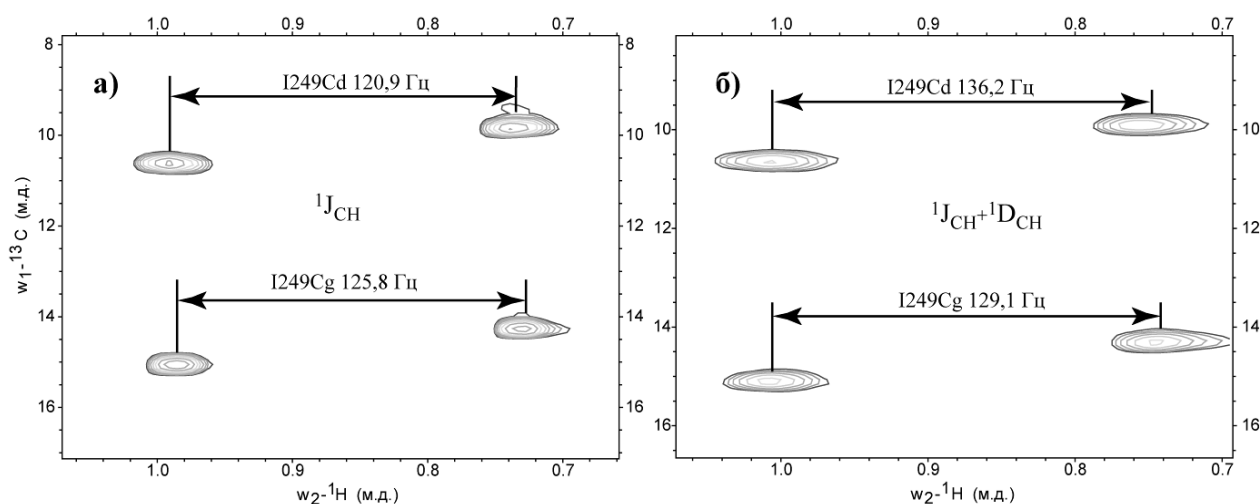


Рисунок 12. Области ^1H - ^{13}C HSQC-HECADE ЯМР спектров пептида РАР248-261 в воде (а) и смеси C_{12}E_5 , гексанола и воды (б).

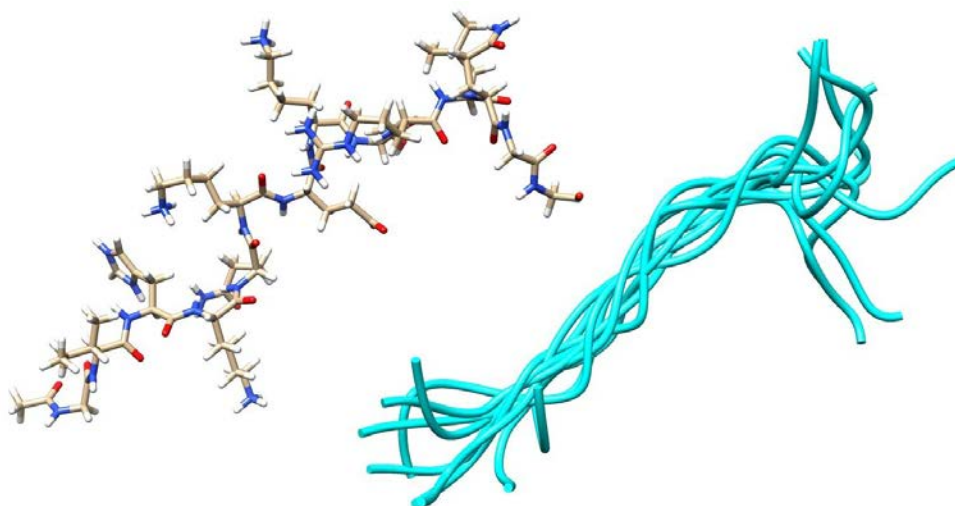


Рисунок 13. Пространственная структура пептида РАР248-261 в растворе (слева), справа - ансамбль из 10 структур (основная цепь без радикалов).

При изучении структуры РАР248-261 в комплексе «протеин-модель заряженной поверхности биологической мембраны» была использована методика, основанная на ядерном эффекте Оверхаузера (ЯЭО) (определение межъядерных расстояний). Как указывалось ранее, в качестве модели заряженной поверхности биологической мембраны были выбраны мицеллы на основе додецилсульфата натрия. ЯЭО стало возможно использовать за счет того, что при образовании комплекса пептида с мицеллой ДСН они переходят под условие медленного движения, и повышается информативность NOESY спектров.

Пептид РАР248-261 был растворен в воде с мицеллами на основе додецилсульфата натрия. Отнесение ^1H ЯМР сигналов сделано, опираясь на данные исследования в растворе и двумерного эксперимента ЯМР ^1H - ^1H TOCSY.

Образование комплекса в данной системе подтверждается двумя фактами. Во-первых, изменением химических сдвигов олигопептида при смене среды, что свидетельствует об изменении химического окружения ядер исследуемой молекулы. Во-вторых, наблюдающиеся положительные кросс-пики в двумерном ЯМР ^1H - ^1H NOESY спектре означают, что скорость движения молекулы уменьшилась.

Для определения межъядерных расстояний внутри молекулы пептида были проведены NOESY ЯМР эксперименты: записаны и проанализированы ^1H - ^1H NOESY ЯМР спектры (как пример, рисунок 14). Было определено всего 93 межъядерных расстояния: из них 7 расстояний между ядрами водорода ^1H NH групп различных аминокислотных остатков, 12 – между водородами α -группы и NH, 23 – между различными аминокислотными остатками, 51 – внутри одного аминокислотного остатка. Значения этих расстояний использовались в качестве входных данных при расчете пространственной структуры PAP248-261 в мицеллярном растворе в программе XPLOR-NIH [2].

Полученные 10 структур с минимальной энергией представлены на рисунке 15 слева, справа на рисунке представлена модель комплекса пептида с мицеллой ДСН. Среднее квадратичное отклонение (СКО) основной цепи участка Lys251 – Arg257 для выбранных 10 структур составило $0,61 \pm 0,21 \text{ \AA}$. Пространственная структура PAP248-261 в комплексе, также как и в растворе, имеет вид «случайного клубка».

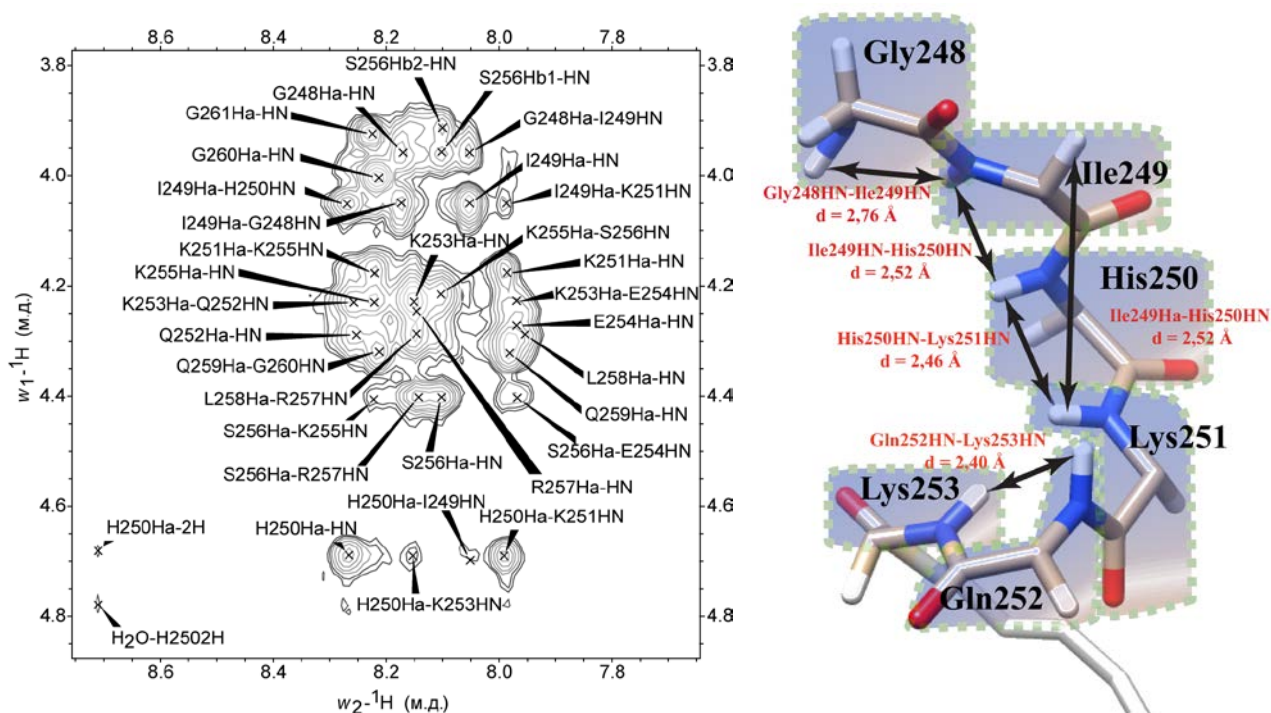


Рисунок 14. Слева: часть двумерного ^1H - ^1H NOESY ЯМР спектра (500 МГц) пептида PAP248-261 (GINKQKEKSRLQGG) в мицеллярном растворе на основе додецилсульфата натрия (50мМ). Время смешивания $\tau_m=350$ мс. $T=288$ К.

Справа: участок основной цепи пептида PAP248-261 с межъядерными расстояниями.

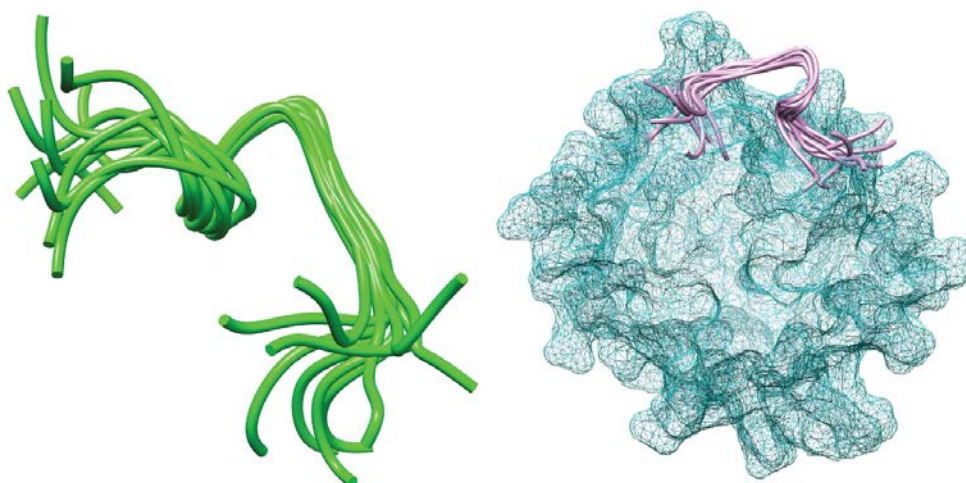


Рисунок 15. Пространственная структура пептида PAP248-261 в мицеллярном растворе на основе додецилсульфата натрия (50мМ), ансамбль из 10 структур – слева; модель комплекса пептида с мицеллой ДСН - справа.

Аналогичным образом были определены пространственные структуры всех исследуемых в работе фрагментов PAP248-286 в водном растворе (рисунок 16) и в комплексе с моделью заряженной поверхности биологической мембраны (рисунок 17). Пространственную структуру фрагмента PAP262-270 в водном растворе получить не удалось из-за плохой растворимости образца.

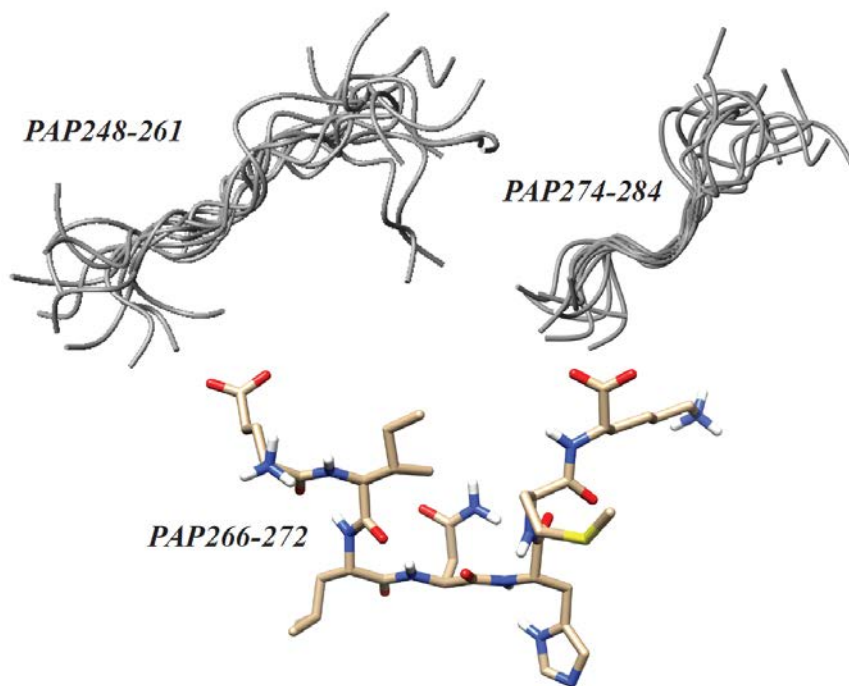


Рисунок 16. Пространственные структуры фрагментов PAP248-286 в водном растворе ($\text{H}_2\text{O}+\text{D}_2\text{O}/90\%+10\%$): PAP248-261, PAP266-272, PAP 274-284.

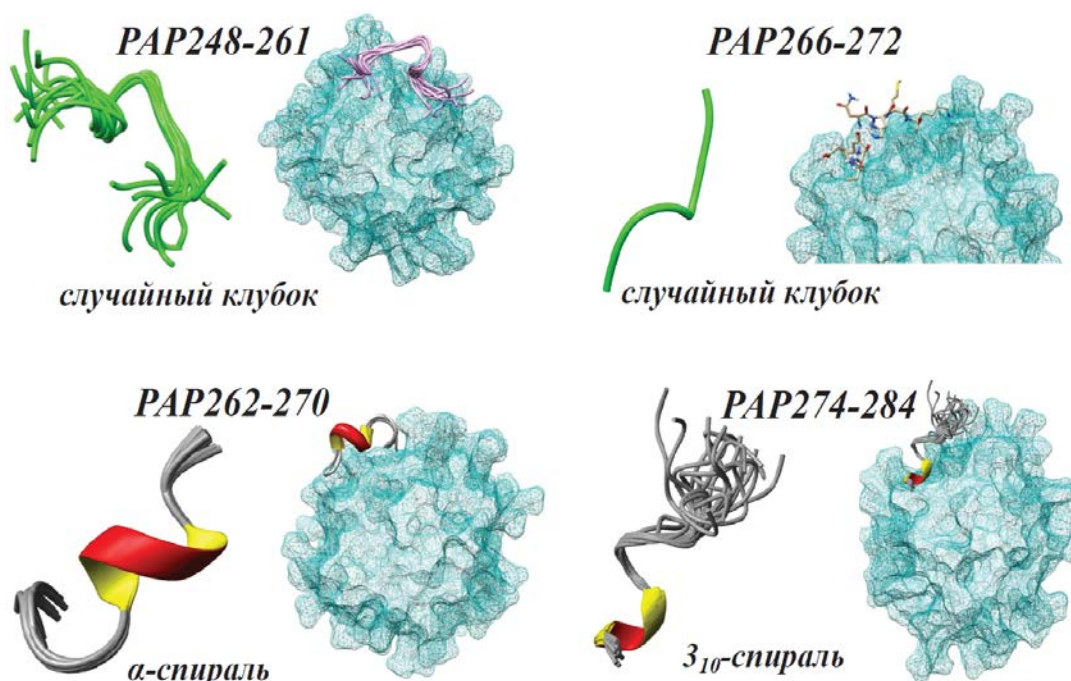


Рисунок 17. Пространственные структуры фрагментов пептида PAP248-286 в комплексе «пептид-модель поверхности биологической мембраны»: PAP248-261, PAP266-272, PAP262-270, PAP 274-284.

Из структурных исследований фрагментов пептида PAP248-286 в комплексе с моделью заряженной поверхности биологической мембраны было установлено, что на участках PAP265-268 и PAP281-283 имеется вторичная структура в виде α -спирали и 3_{10} -спирали, соответственно (рисунок 18). На основе этого можем предположить, что эти участки являются активными центрами PAP248-286 в процессе взаимодействия с мембраной.

Ранее коллегами был исследован изотопно обогащенный пептид PAP248-286 в комплексе с мицеллами ДСН [3, 6]. В их работе эти центры так же отмечались, как центры комплексообразования. Наши данные для этих центров в отдельных фрагментах подтверждает их активность, так как она не пропадает даже при делении белка, сохраняется вторичная структура, участвующая в комплексообразовании «пептид – модель поверхности биологической мембраны».

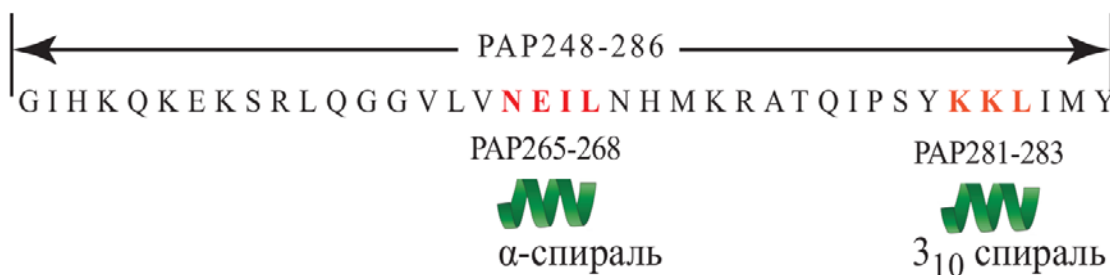


Рисунок 18. Активные участки пептида PAP248-286, обладающие вторичной структурой в комплексе «пептид – модель заряженной поверхности биологической мембраны».

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

На основании данных одномерной ЯМР (^1H , ^{13}C) спектроскопии, включая анализ величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия, и на использовании современных подходов в ЯМР, таких как двумерная гомоядерная (COSY, TOCSY и др.), гетероядерная корреляционная (^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{15}N HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC и др.) и двумерная ЯМР NOESY (^1H - ^1H) спектроскопия и теоретического моделирования молекулярной структуры (с использованием программы XPLOR-NIH):

- 1 Разработан подход для мониторинга формирования мицеллярных систем на основе додецилсульфата натрия (ДСН) в растворе с помощью двумерной ^1H - ^1H NOESY ЯМР спектроскопии.
- 2 Предложен метод описания пространственной структуры олигопептидов на основе определения межъядерных расстояний (метод двумерной ^1H - ^1H NOESY ЯМР спектроскопии) путем перевода исследуемого низкомолекулярного соединения из разряда малых молекул (условие быстрого движения) в разряд молекул, подпадающих под условие медленного движения за счёт образования комплекса олигопептидов с мицеллами поверхностно-активного вещества (ДСН).
- 3 Впервые определено пространственное строение олигопептидов - тетрапептида SFVG (в комплексе), декапептида VIKKSTALLG и фрагментов пептида PAP248-286 (PAP248-261, PAP266-272, PAP262-270 (в комплексе), PAP274-284) в растворе (оценочный характер) и комплексе с моделью заряженной поверхности биологической мембраны. Получены координаты атомов, входящих в состав исследованных соединений в формате pdb файла.
- 4 Впервые установлено наличие вторичной структуры в олигопептидах PAP262-270 и PAP274-284 в виде α -спирали и 3_{10} -спирали, соответственно, в комплексе с мицеллами ДСН.
- 5 Предложены и описаны модели исследуемых комплексов «пептид-поверхность биологической мембраны». Выдвинуто предположение, что фрагменты PAP265-268 (Asn265 – Leu268) и PAP281-283 (Lys281 – Leu283) являются активными сайтами PAP248-286, которые могут участвовать в связывании вириона вируса ВИЧ с поверхностью мембраны.

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Delaglio F., Grzesiek S., Vuister G. W., Zhu G., Pfeifer J., Bax A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes // J Biomol NMR. – 1995. – Т. 6, № 3. – С. 277-93.
2. Schwieters C. D., Kuszewski J. J., Tjandra N., Clore G. M. The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package // J Magn Reson. – 2003. – Т. 160, № 1. – С. 65-73.

3. Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions. / Ernst R. R., Bodenhausen B., Wokaun A. – Oxford: Oxford University Press, 1987.
4. Klochkov V. V., Baikhev R. F., Skirda V. D., Klochkov A. V., Muhamadiev F. R., Baskyr I., Berger S. Spatial structure of peptides determined by residual dipolar couplings analysis // Magnetic Resonance in Chemistry. – 2009. – Т. 47, № 1. – С. 57-62.
5. Hassan M. I., Aijaz A., Ahmad F. Structural and functional analysis of human prostatic acid phosphatase // Expert Review of Anticancer Therapy. – 2010. – Т. 10, № 7. – С. 1055-1068.
6. Roan N. R., Munch J., Arhel N., Mothes W., Neidleman J., Kobayashi A., Smith-McCune K., Kirchhoff F., Greene W. C. The Cationic Properties of SEVI Underlie Its Ability To Enhance Human Immunodeficiency Virus Infection // Journal of Virology. – 2009. – Т. 83, № 1. – С. 73-80.
7. Braun W., Wider G., Lee K. H., Wuthrich K. Conformation of glucagon in a lipid-water interphase by ¹H nuclear magnetic resonance // J Mol Biol. – 1983. – Т. 169, № 4. – С. 921-48.
8. Motta A., Pastore A., Goud N. A., Morelli M. A. C. Solution Conformation of Salmon-Calcitonin in Sodium Dodecyl-Sulfate Micelles as Determined by 2-Dimensional Nmr and Distance Geometry Calculations // Biochemistry. – 1991. – Т. 30, № 43. – С. 10444-10450.
9. Wang G. S., Keifer P. A., Peterkofsky A. Solution structure of the N-terminal amphitropic domain of Escherichia coli glucose-specific enzyme IIA in membrane-mimetic micelles // Protein Science. – 2003. – Т. 12, № 5. – С. 1087-1096.
10. Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy. / Rule G.S. H. T. K.: Springer, 2006. – 531 с.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Блохин, Д.С.** Пространственное строение декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly, определенное анализом величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия. [Текст] / Д.С. Блохин, С.В. Ефимов, А.В. Ключков, А.Р. Юльметов, А.В. Филиппов, В.В. Ключков // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. Науки. – 2010. – Т. 152, кн. 3 – С. 36-47.
2. **Блохин Д.С.** Пространственное строение декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в комплексе протеин – мицеллы додецилсульфата натрия [Текст]/ Д.С. Блохин, С.В. Ефимов, А.В. Ключков, А.Р. Юльметов, А.В. Филиппов, В.В. Ключков, А.В. Аганов// Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. Науки. – 2011. – Т. 153, кн. 1 – С. 59-70.
3. **Blokhin D.S.** Spatial structure of the decapeptide Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly in water and in a complex with sodium dodecyl sulfate micelles [Text]/ D.S. Blokhin, S.V. Efimov, A.V. Klochkov, A.R. Yulmetov, A.V. Filippov, O.N. Antzutkin, A.V. Aganov, V.V. Klochkov // Applied Magnetic Resonance – 2011 – Vol. 41, I. 2, P. 267-282.

4. **Blochin, D.S.** Spatial structure of heptapeptide Gly-Ile-Leu-Asn-His-Met-Lys, a fragment of HIV enhancer prostatic acid phosphatase, in aqueous and in SDS micelle solutions [text] /D.S. Blochin, O.V. Aganova, A.R. Yulmetov, A.V. Filippov, O.N. Antzutkin, B.I. Gizatullin, S. Afonin and V.V. Klochkov//J. Molecular Structure. 2013. V.1033.P.59-66.
5. **Блохин, Д.С.** Способы контроля образования мицеллярных систем на основе додецилсульфата натрия в растворе и пространственное строение тетрапептида nAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe в комплексе протеин - мицеллы по данным спектроскопии ЯМР [текст] / Д.С.Блохин, М.А.Кулькова, В.В.Клочков // Ученые Записки Казанского Университета. - 2012. - Т. 154, Серия Естественные науки, книга 4, с.80-91.
6. Рахматуллин, И.З. Пространственное строение усиливающего вич гептапептида Glu-Ile-Leu-Asn-His-Met-Lys в растворе и комплексе: гептапептид - модель биологической мембраны [текст] / И.З. Рахматуллин, Д.С. Блохин, О.В. Аганова, А.Р. Юльметов, А.В. Филиппов, А.В. Аганов, В.В. Клочков // Ученые Записки Казанского Университета. - 2012. - Т. 154, Серия Физико-математические науки, книга 1. С. 63-73.
7. **Blokhin, D.S.** Spatial structure of tetrapeptide N-AC-Ser-Phe-Val-Gly-OMe in "protein-micelle of sodium dodecyl sulfate" complex and in solid state by NMR spectroscopy [Text] / D.S. Blokhin, S. Berger, V.V. Klochkov // Magnetic Resonance in Solids (Electronic Journal). - 2013. - Vol. 15, No.2. - 13202 (7 pp).
8. **Blokhin, D.S.** Spatial structure of oligopeptide PAP(248-261), the N-terminal fragment of the HIV enhancer prostatic acid phosphatase peptide PAP(248-286), in aqueous and SDS micelle solutions [Text] / D.S. Blokhin, A.V. Filippov, O.N. Antzutkin, F.K. Karataeva, V.V. Klochkov // J. Molecular Structure. 2014. V.1070. P.38-42.
9. **Blokhin D.S.** NOE effect of sodium dodecyl sulfate in monomeric and micellar systems by NMR spectroscopy [Text]/ D.S. Blokhin, E.A.Filippova, V.V. Klochkov // Applied Magnetic Resonance – 2014 – Vol. 45, I. 8, P. 715-721.
10. **Блохин, Д.С.** Пространственная структура декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly, определенная анализом величин остаточного диполь дипольного взаимодействия. [Текст] / Д.С. Блохин//Итоговая научно-образовательная конференция студентов Казанского Университета. Сборник тезисов – Казань, КФУ —2010 — С.40.
11. **Блохин, Д.С.** Пространственное строение декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly, определенное анализом величин остаточного диполь дипольного взаимодействия. [Текст] / Д.С. Блохин, С.В. Ефимов, А.В. Клочков, А.Р. Юльметов, А.В. Филиппов, В.В. Клочков //III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии "МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА ": Сборник материалов – Москва, МГУ – 2010. – Т. 1 – С. 189-191.

12. **Блохин, Д.С.** Пространственная структура декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly, определенная анализом величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия. [Текст] / Д.С. Блохин, С.В. Ефимов, А.В. Ключков, А.Р. Юльметов, А.В. Филиппов, А.В. Аганов, В.В. Ключков // Магнитный резонанс в химической и биологической физике: Сборник тезисов – Новосибирск – 2010. – С. 76.
13. **Блохин, Д.С.** Пространственное строение декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в водном растворе и в комплексе протеин – мицеллы додецилсульфата натрия [Текст] / Д.С. Блохин, С.В. Ефимов, А.В. Ключков, А.Р. Юльметов, А.В. Филиппов, А.В. Аганов, В.В. Ключков // V Всероссийская конференция «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях» при участии зарубежных учёных с элементами школы для молодых исследователей: Сборник тезисов – Казань, КФУ – 2011. – С. 86-87.
14. **Рахматуллин, И.З.** Пространственное строение усиливающего ВИЧ гептапептида Glu-Ile-Leu-Asn-His-Met-Lys в растворе и комплексе: гептапептид–модель биологической мембраны [Текст] / И.З. Рахматуллин, **Д.С. Блохин**, А.Р. Юльметов, А.В. Филиппов, А.В. Аганов, В.В. Ключков // V Всероссийская конференция «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях» при участии зарубежных учёных с элементами школы для молодых исследователей: Сборник тезисов – Казань, КФУ – 2011. – С. 131-133.
15. **Blokhin, D.S.** Methods to control formation of micellar systems of sodium dodecyl sulfate in solution [text] / D.S. Blokhin, V.V. Klochkov // XV International Youth Scientific School. "Actual problems of magnetic resonance and its application": Program lecture notes proceedings – Kazan, Kazan University – 2012. – P. 52-55.
16. **Блохин, Д.С.** Структура начального фрагмента PAP248-261 ВИЧ-активного пептида PAP248-286 в растворе и в комплексе с модельными мембранами [текст] / Д.С. Блохин, А.В. Филиппов, О.Н. Анцуткин, В.В. Ключков // Сборник трудов международного симпозиума «Биохимия – основа наук о жизни», посвященного 150-летию образования кафедры биохимии Казанского университета – Казань, Казанский Федеральный Университет – 2013. – С.61-62.
17. **Блохин, Д.С.** Установление активных центров пептида PAP248-286, отвечающего за усиление инфекционной активности вируса ВИЧ методами ЯМР спектроскопии высокого разрешения [текст] / Д.С. Блохин, А.В. Филиппов, В.В. Ключков // Материалы конференции «XX Всероссийская научная конференция студентов-физиков и молодых ученых»- Ижевск, УдГУ – 2014. – С.368-369.

